

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2001 01 18

申 请 号： 01 1 03102.6

申 请 类 别： 发明专利

发明创造名称： 一种天花粉蛋白突变体及制备方法

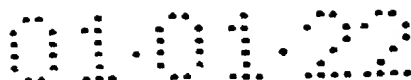
申 请 人： 中国科学院上海细胞生物学研究所

发明人或设计人： 柯一保； 聂慧玲

中华人民共和国
国家知识产权局局长

王 荣 川

2001 年 7 月 17 日



66

权 利 要 求 书

1、一种天花粉蛋白突变体产品，其特征在于该产品改变了天花粉蛋白序列的第 174 位到 180 位、203 位到 226 位、230 位到 247 位计 49 个氨基酸残基中的任意一个或一个以上氨基酸残基的被缺失或被改造，包括极性氨基酸残基与非极性氨基酸残基的互变，酸性与碱性氨基酸残基的互变，或被接上其它化学基团或在上述三段氨基酸顺序中插入一个或一个以上其它氨基酸残基等原因而引起的电荷的改变；改变之二是在羧基末端再加接两个或两个以上的非极性氨基酸或氨基酸残基，成为与天然 TCS 结构有差异的、具有优秀性能的新的天花粉蛋白突变体。

2、根据权利要求 1 所述的一种天花粉蛋白突变体，其特征在于其中所述的一级结构的改变，涉及的极性氨基酸是指丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、半胱氨酸(Cys)、酪氨酸(Tyr)、天门冬氨酸(Asp)、天门冬酰胺(Asn)、谷氨酸(Glu)、谷氨酰胺(Gln)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)或组氨酸(His)。其中，Asp、Asn、Glu、Gln 为酸性氨基酸，Lys、Arg、His 为碱性氨基酸；非极性氨基酸是指甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、脯氨酸(Pro)、苯丙氨酸(Phe)、色氨酸(Trp)或甲硫氨酸(Met)。

3、一种如权利要求 1 所述的天花粉蛋白突变体产品的制备方法，其特征在于该方法包括下列步骤：

(1) 对原 TCS 基因的改造

利用分子生物学领域工作者均已知的 DNA 的定点突变方法，包括单链模板法和双链模板法(即 PCR 法)对原始的天然 TCS 基因进行突变改造：

a. 在编码成熟 TCS 的 DNA 序列的 5'端前引进限制性内切酶 Nco I 位点 (CCATGG)，由此引进起始密码子，同时将编码的原成熟 TCS 的 N 端前加了一个甲硫氨酸；或引进限制性内切酶 Nde I 位点 (CATATG)，由此同时使编码的原成熟 TCS 的第一个氨基酸残基从天门冬氨酸改为甲硫氨酸；

在编码成熟 TCS 的 DNA 序列的 3'端后引进限制性内切酶 Bam H I 位点 (GGATCC)，由此同时引进了终止密码子；

b. 对编码恰当部位氨基酸残基(174-180、203-226、230-247)的 DNA 序列进行改造，以及对编码 247 位氨基酸密码子后的延伸，以获得本发明的天花粉蛋白突变体的基因；

(2) MTCS 的表达

将具有优秀性能的天花粉蛋白突变体的基因用 Nco I(或 Nde I)和 Bam H I 双酶切后克隆进质粒载体 pET-2d(或 pET-3a)，常规方法转

化受体菌大肠杆菌 BL 21(DE3, plysS), 转化子在 37°C 用 LB 培养液 (含 Ap, Chl) 中培养过夜后, 用 M9ZB 培养液 (含 Ap, Chl) 在同样温度放大发酵培养至 570mu 的光吸收为 0.8 左右, 加诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.5mM, 继续培养 3 小时后离心收集菌体, 菌体经超声破碎后, 离心取上清液上 CM-Sephadex 或 CM-Sephrose 柱层析分离纯化, 其主峰即为 MTCS 产品。

一种天花粉蛋白突变体及制备方法

本发明涉及基因工程，具体涉及一种天花粉蛋白突变体 (Mutant of Trichosanthin, MTCS) 及制备方法。

天花粉是我国传统医学的中药，来源于葫芦科植物栝楼 (*Trichosanthes Kirilowii* M.) 的根，有二千余年医学临床应用历史。从中分离纯化的一种分子量为27KD的蛋白质称为天花粉蛋白 (Trichosanthin, TCS)，它的化学本质为一种单链的核糖体失活蛋白 (Ribosome Inactivating Protein, RIP)，能特异切除真核细胞28S rRNA 上第4324位腺嘌呤，从而阻断蛋白质的合成。具有“清热解毒”作用。六十年代人们进一步研究发掘了它的“终止妊娠”的能力。60年代后期中国临床上已用于怀孕妇女的中期引产和治疗葡萄胎。1989年美国科学家发现了它能抑制人免疫缺陷病毒(HIV)在急性感染的T淋巴细胞和慢性感染的巨噬细胞中复制 (见文献报道，Mcgrath MS, Hwang KM., Caldwell SE, et al. GLQ223: An inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte and mononuclear phagocyte lineage. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 2844~2848)，并在临床上试用于艾滋病人的治疗。我们和其他学者还发现天花粉蛋白还具有一定程度抗许多其它病毒、抗白血病和抗其它肿瘤的能力 (见文献报道，孔梅，柯一保，周美云等。天花粉蛋白诱发白血病细胞K562凋亡的研究。实验生物学报，1998, 31 (3): 233~243. Zheng YT, Zhang KL, Ben KL, et al. In vitro immunotoxicity and cytotoxicity of trichosanthin against human normal immunocytes and leukemia-lymphoma cells. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 1995, 17 (1): 69~79. 吴裕新，项丹妮，章水平等。天花粉蛋白对胃结肠癌细胞的杀伤作用及其机制的研究。中华消化杂志。1993. 13(3): 263-266。)。但是，在天花粉蛋白作为引产药物应用时，中国科学家就发现了它偶尔会引起通过IgE介导的速发性过敏反应，因而每个引产妇女一生中只能注射一次，极大地限制了它的应用范围。

本发明的目的在于克服上述不足之处，研制一种过敏原性低、能反复使用的新的天花粉蛋白产品。

本发明提供了一种天花粉蛋白突变体产品 (MTCS)，它是从天然天花粉蛋白的基因人工突变改造后，利用合适的表达系统得到的。

天然天花粉蛋白 (TCS) 是由 247 个氨基酸残基组成, 其氨基酸序列的一级结构如下式表示:

ATGATCAGA
Met Ile Arg

TTC TTA GTC CTC TCT TTG CTA ATT CTC ACC CTC TTC CTA ACA ACT CCT GCT GTG GAG GGC ↓
Phe Leu Val Leu Ser Leu Leu Ile Leu Thr Leu Phe Leu Thr Thr Pro Ala Val Glu Gly
1
GAT GTT AGC TTC CGT TTA TCA GGT GCA ACA AGC AGT TCC TAT GGA GTT TTC ATT TCA AAT
Asp Val Ser Phe Arg Leu Ser Gly Ala Thr Ser Ser Ser Tyr Gly Val Phe Ile Ser Asn
10
CTG AGA AAA GCT CTT CCA AAT GAA AGG AAA CTG TAC GAT ATC CCT CTG TTA CGT TCC AGT
Leu Arg Lys Ala Leu Pro Asn Glu Arg Lys Leu Tyr Asp Ile Pro Leu Leu Arg Ser Ser
20
CTT CCA GGT TCT CAA CGC TAC GCA TTG ATC CAT CTC ACA AAT TAC GCC GAT GAA ACC ATT
Leu Pro Gly Ser Gln Arg Tyr Ala Leu Ile His Leu Thr Asn Tyr Ala Asp Glu Thr Ile
30
TCA GTG GCC ATA GAC GTA ACG AAC GTC TAT ATT ATG GGA TAT CGC GCT GGC GAT ACA TCC
Ser Val Ala Ile Asp Val Thr Asn Val Tyr Ile Met Gly Tyr Arg Ala Gly Asp Thr Ser
40
TAT TTT TTC AAC GAG GCT TCT GCA ACA GAA GCT GCA AAA TAT GTA TTC AAA GAC GCT ATG
Tyr Phe Phe Asn Glu Ala Ser Ala Thr Glu Ala Ala Lys Tyr Val Phe Lys Asp Ala Met
50
CGA AAA GTT ACG CTT CCA TAT TCT GGC AAT TAC GAA AGG CTT CAA ACT GCT GCA GGC AAA
Arg Lys Val Thr Leu Pro Tyr Ser Gly Asn Tyr Glu Arg Leu Gln Thr Ala Ala Gly Lys
60
ATA AGG GAA AAT ATT CCG CTT GGA CTC CCT GCT TTG GAC AGT GCC ATT ACC ACT TTG TTT
Ile Arg Glu Asn Ile Pro Leu Gly Leu Pro Ala Leu Asp Ser Ala Ile Thr Thr Leu Phe
70
TAC TAC AAC GCC AAT TCT GCT GCG TCG GCA CTT ATG GTA CTC ATT CAG TCG ACG TCT GAG
Tyr Tyr Asn Ala Asn Ser Ala Ala Ser Ala Leu Met Val Leu Ile Gln Ser Thr Ser Glu
80
GCT GCG AGG TAT AAA TTT ATT GAG CAA CAA ATT GGG AAG CGT GTT GAC AAA ACC TTC CTA
Ala Ala Arg Tyr Lys Phe Ile Glu Gln Gln Ile Gly Lys Arg Val Asp Lys Thr Phe Leu
90
CCA AGT TTA GCA ATT ATA AGT TTG GAA AAT AGT TGG TCT GCT CTC TCC AAG CAA ATT CAG
Pro Ser Leu Ala Ile Ile Ser Leu Glu Asn Ser Trp Ser Ala Leu Ser Lys Gln Ile Gln
100
ATA GCG AGT ACT AAT AAT GCA CAG TTT GAA AGT CCT GTT GTG CTT ATA AAT GCT CAA AAC
Ile Ala Ser Thr Asn Asn Gly Gln Phe Glu Ser Pro Val Val Leu Ile Asn Ala Gln Asn
110
CAA CGA GTC ACG ATA ACC AAT GTT GAT GCT GGA GTT GTA ACC TCC AAC ATC GCG TTG CTG
Gln Arg Val Thr Ile Thr Asn Val Asp Ala Gly Val Val Thr Ser Asn Ile Ala Leu Leu
120
CTG AAT AGA AAC AAT ATG GCA ↓ GCC ATG GAT GAC GAT GTT CCT ATG ACA CAG AGC TTT
Leu Asn Arg Asn Asn Met Ala Ala Met Asp Asp Asp Val Pro Met Thr Gln Ser Phe
130
GGA TGT GGA AGT TAT GCT ATT TAG
Gly Cys Gly Ser Tyr Ala Ile End

上式中的数字表示氨基酸序号

MTCS 的一级结构组成保留了天然 TCS 结构的绝大多数氨基酸序列。其特征之一在于天花粉蛋白质的第 174 位到 180 位、203 位到 226 位、230 位到 247 位计 49 个氨基酸残基中的任意 1 个或 1 个以上氨基酸残基的被缺失或被改造, 包括极性氨基酸残基与非极性氨基酸残基的互变, 酸性与碱性氨基酸残基的互变, 或被接上其它化学基团或在上述三段氨基酸顺序中插入一个或一个以上其它氨基酸残基等原因而引起的电荷的改变; 特征之二在于羧基末端再加接两

个或两个以上的非极性氨基酸或氨基酸残基。上述 MTCS 结构特征的出现，成为与天然 TCS 结构有差异的、具有优秀性能的新的天花粉蛋白突变体，它极大地降低了天花粉蛋白的过敏原性，但保留了 TCS 的一切生物学活性。

该产品一级结构的改变，涉及的极性氨基酸的概念是指丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、半胱氨酸(Cys)、酪氨酸(Tyr)、天门冬氨酸(Asp)、天门冬酰胺(Asn)、谷氨酸(Glu)、谷氨酰胺(Gln)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、组氨酸(His)等十一种氨基酸。其中，Asp、Asn、Glu、Gln 为酸性氨基酸，Lys、Arg、His 为碱性氨基酸；非极性氨基酸的概念是指甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、脯氨酸(Pro)、苯丙氨酸(Phe)、色氨酸(Try)、甲硫氨酸(Met)等九种氨基酸。

本发明的天花粉蛋白突变体产品(MTCS)的免疫学活性及药效测试结果如下：

一、TCS 部分缺失蛋白和突变蛋白的性质

为了探索一级结构与生物学活性与免疫学活性的关系，从基因水平将 TCS 进行改造，获得了多个氨基酸残基被改造和 C 末端缺失的基因，经大肠杆菌表达、纯化后分别获得了相应的多个氨基酸残基被改造和 C 末端缺失的蛋白质。由于 TCS 及其突变体是一种 RNA N-糖苷酶，可使核糖体失活，从而阻断蛋白质的合成，因而经检测这些突变体和 C 末端有明确缺失部位的突变体的系列蛋白的生物学与免疫学活性后，结合 TCS 的空间结构分析，作活性区域的结构基础判断资料。RIP 活性依 Pelhem & Jackson 的方法进行；抗生育活性按我们实验室的常规方法进行，体外免疫反应用 Elisa 方法检测。

实验结果可列表如下所示：

| 产品 | C 端 AA 变动 缺失位置 | 更动位置 | RIP 活性* | 抗生育 活性** | 体外免疫 反应能力 IgG*** | 体外免疫 反应能力 IgE*** |
|-----------------------------------------------|-------------------|------|------------|-------------|------------------------|------------------------|
| NTCS ¹⁻²⁴⁷ | 0 | 0 | ++ | ++ | ++ | ++ |
| L ₃ TCS ¹⁻²⁴⁴ | 247-244 | 0 | ++ | ++ | ++ | ++ |
| L ₁₀ TCS ¹⁻²³⁷ | 247-239 | 0 | ++ | ++ | ++ | ++ |
| L ₁₄ TCS ¹⁻²³² | 247-233 | 0 | ++ | ++ | + | + |
| L ₂₉ TCS ¹⁻²¹⁸ | 247-219 | 0 | + | + | ± | ± |
| L ₄₆ TCS ¹⁻²⁰¹ | 247-202 | 0 | + | + | ± | ± |
| L ₆₂ TCS ¹⁻¹⁹⁵ | 247-196 | 0 | ± | ± | — | — |
| L ₆₇ TCS ¹⁻¹⁸⁰ | 247-181 | 0 | — | — | — | — |
| L ₇₄ TCS ¹⁻¹⁷³ | 247-174 | 0 | — | — | — | — |
| L ₁₁ TCS ^{1-173, 181-247} | 174-180 | 0 | ± | ± | ± | ± |

| | | | | | |
|-----------------------------------------------|--------------------|----|----|---|---|
| L ₆₂ TCS ^{1-173, 181-202} | 247-203, 180-174 0 | — | — | — | — |
| M ₇ TCS ¹⁻²⁴⁷ | 0 180-174 | ++ | ++ | ± | ± |
| M ₂₄ TCS ¹⁻²⁴⁷ | 0 226-203 | ++ | ++ | ± | ± |
| M ₃₁ TCS ¹⁻²⁴⁷ | 0 226-203, 180-174 | ++ | ++ | — | — |

注: NTCS 为天然 TCS; LTCS 为缺失体 TCS; MTCS 为突变体 TCS。

*RIP 活性 IC₅₀(ng/ml): ≤50 ++, <50→≥500 +, <500→≥5000 ±, >5001 —;

**抗生育活性%: ≥80 ++, <80→≥30 +, <30→≥5 ±, <5 —;

***体外免疫反应能力%: ≥ ++, <80→≥30 +, <30→≥10 ±, <10 —。

在 M₃₁TCS^(M226-203, 180-174) 这个突变体中, 有二个突变区域, 序列 174-180 和序列 203-226, 其中可被突变或缺失的极性氨基酸残基共 18 个, 非极性氨基酸残基共 3 个。这二个区域分别可有一个或一个以上 (174—180) 或二个或二个以上 (203—226) 的极性氨基酸残基被突变改造或缺失, 在 174-180 区域还可有 3 个非极性氨基酸残基被缺失。

174-180 区域可被突变的氨基酸的序列分布列表为:

| 原氨基酸残基及其序号 | 优选改造成的氨基酸残基 |
|----------------------|-------------|
| Arg ¹⁷⁴ 、 | Glu、Asp、Gly |
| Asp ¹⁷⁶ | Lys、Gly |
| Lys ¹⁷⁷ | Glu、Asp、Gly |
| Thr ¹⁷⁸ | Gly、Ala |
| Val ¹⁷⁵ | 缺失 |
| Phe ¹⁷⁹ | 缺失 |
| leu ¹⁸⁰ | 缺失 |

203-226 区域可被突变的氨基酸的序列分布列表为:

| 原氨基酸残基及其序号 | 优选改造成的氨基酸残基 |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Ser ²⁰³ 、Ser ²¹¹ | Gly、Ala |
| Thr ²⁰⁴ 、Thr ²²⁴ 、Thr ²²⁶ | Gly、Ala |
| Asn ²⁰⁵ 、Asn ²⁰⁶ 、Asn ²¹⁷ 、Asn ²²⁰ | Lys、Gly |
| Gln ²⁰⁸ 、Gln ²¹⁹ 、Gln ²²¹ | Lys、Gly |
| Glu ²¹⁰ | Lys、Gly |
| Arg ²²² | Glu、Asp、Gly |

230-247 区域可被突变的氨基酸的序列分布列表为

| 原氨基酸残集及其序号 | 优选改造成的氨基酸残基 |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Ala ²³⁰ 、Ala ²³⁸ 、Ala ²⁴⁷ | 缺失 |
| Gly ²³¹ | 缺失 |
| Val ²³² 、Val ²⁵³ | 缺失 |
| Thr ²³⁴ | Gly、Ala |
| Ser ²³⁵ | Gly、Ala |
| Asn ²³⁶ 、Asn ²⁴² 、Asn ²⁴⁴ 、Asn ²⁴⁵ | Lys、Gly |
| Ile ²³⁷ | 缺失 |
| Leu ²³⁹ 、Leu ²⁴⁰ 、Leu ²⁴¹ | 缺失 |
| Arg ²⁴³ | Glu、Asp、Gly |
| Met ²⁴⁶ | 缺失 |

优选双突变位点:

| 区域 | 优选双突变位点 |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 174-180 | Arg ¹⁷⁴ 与 Asp ¹⁷⁸ 或 Lys ¹⁷⁷ 与 Thr ¹⁷⁸ |
| 203-226 | Ser ²⁰³ 与 Thr ²⁰⁴ 或 Glu ²¹⁰ 与 Thr ²²⁶ |

从上述基因缺失而获得的缺失体蛋白质(L-TCS)和基因突变获得的突变体蛋白质(M-TCS)的主要性质检测结果表明:随着 C 末端氨基酸残基缺失程度的逐渐加大至缺失 10 个氨基酸残基,它们的 IgG 与 IgE 体外检测免疫活性也如同 NTCS 一样呈现强阳性;缺失程度加大至 14 个氨基酸残基后,免疫活性则有所下降,但使核糖体失活和致孕鼠中期引产的两种生物学活性尚未受到影响。直至缺失 29 个氨基酸残基,它的生物学活性才受到影响。按笔者以往所述,TCS 的生物学活性部位在序列 110 至 174 区域,但末端氨基酸一定程度的缺失引起的空间结构的松弛变化对活性区域仍有影响,且这种氨基酸残基缺失越接近活性中心区域,失活越大,直至失去全部活性。免疫活性区域较生物学活性区域结构排列在后,比较接近羧基末端,因而较早受到氨基酸缺失的结构影响。至缺失 29 个氨基酸残基后,它的免疫活性已降至微弱阳性。与 IgG 和 IgE 相关的体外免疫反应降低为微弱阳性的产品、并且仍然保留着包括 RIP 和抗生育两种活性的蛋白质有 L₂₉TCS¹⁻²¹⁸、L₄₆TCS¹⁻²⁰¹,并且仍然保留两种强生物学活性的有 M₇TCS^(M180-174)和 M₂₄TCS^(M226-203)两种,两种体外免疫活性为阴性而仍然保留两种强生物学活性的为 M₃₁TCS^(M226-203,180-174)一种。这是一种性质尤为优秀,极大地降低了天然天花粉蛋白(NTCS)的免疫原性,也几乎无损生物学活性的新的天花粉蛋白突变体。

二、M-TCS 的性质:

检测体外失活核糖体能力、怀孕小白鼠中期引产能力、体外与 IgG 和 IgE 反应能力和在体外培养下对不同细胞的杀灭情况均为我们实验室的常规应用方法。

1. 经改造后的具有优选性能的 MTCS 产品与天然 TCS 的免疫与生物学活性相比较。总结见下表:

| | NTCS | MTCS |
|-------------------|------|----------|
| 失活核糖体能力 (%) | 100 | 100 |
| 中期引产能力 (%) | 100 | 100 |
| 肿瘤细胞毒性 (K562 细胞株) | 100 | 100 |
| 体外与 IgE 反应能力 (%) | 100 | <10 |
| 体外与 IgG 反应能力 (%) | 100 | <10 |
| 诱发大白鼠体内 IgE 应答情况 | ++ | — (见 3d) |
| 诱发豚鼠急性过敏情况 | ++ | ± (见 3c) |

2. MTCS 对不同细胞的杀灭情况总结于下表:

| CELL LINE | LC ₅₀ (ug/ml) | CELL LINE | LC ₅₀ (ug/ml) | CELL LINE | LC ₅₀ (ug/ml) |
|-----------|-----------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|-----------------------------|
| Jar | 7.0 | B16 | 69.2 | Wish | >1000 |
| HL60 | 8.1 | A431 | 77.6 | *HMPLC | >1000 |
| MLT | 10.0 | B7-325 | 218.8 | | |
| K562 | 11.0 | SPCA1 | 257.0 | | |
| U937 | 17.0 | 7404 | 354.8 | | |

*为人正常外周血淋巴细胞，从临床采集。

从上表中可见，MTCS 对 K562、HL60、MLT、U937 等白血病细胞和 Jar 人绒毛癌细胞的半杀灭剂量 $LC_{50} < 30 \text{ug/ml}$ ，我们称 $LC_{50} \leq 30 \text{ug/ml}$ 的细胞为最敏感的细胞群；MTCS 对 B16、A431、B7-325、SPCA1、7404 等癌细胞的 $LC_{50} > 30 \text{ug/ml}$ 以上，称它们为一般敏感型细胞群；MTCS 对人外周血淋巴细胞和人羊膜细胞等正常体细胞的 $LC_{50} > 1000 \text{ug/ml}$ 以上，称为非敏感型细胞群。这就清楚地明确在一定的剂量条件下，MTCS 对白血病等癌细胞有强烈的杀灭作用；而对正常体细胞不敏感。这与以往对 TCS 的研究相一致。

3. 抗人体癌症动物模型的性质。

a) 药效学研究

将人白血病红白细胞癌的 K562 细胞接种至八周令裸小鼠 (nude mice) 皮下，接种细胞数量为 1×10^7 数量级。接种 10 天后，可见肿瘤在接种部位生成，接种成功率为 50%。选择肿瘤生成鼠随机分为四组，给予不同剂量的 MTCS 注射治疗。并以生理盐水注射鼠作为对

照。在每鼠治疗剂量 \leq 引产剂量(15nm/Kg、45nm/Kg、75nm/Kg)条件下,每四天注射一次,以四次治疗为限,均可见不同程度的抑瘤效应。各治疗组的抑瘤率分别为 $(40\pm 3)\%$ 、 $(71\pm 2)\%$ 和 $(92\pm 4)\%$ 。选用另一种免疫双缺陷动物 Scid 小鼠人体动物模型,继续研究 MTCS 的对红白细胞癌(K562)的杀灭效应。选用九周龄 Scid 小鼠给予 K562 细胞接种,接种细胞数量同裸小鼠,接种成功率为 100%。在接种后第五天,随机将小鼠分为四组,其中三组为 MTCS 治疗组,另一组为生理盐水对照组。治疗组按高、中、低不同剂量进行注射治疗。分为 150nm/kg 一次注射组、75nm/kg 二次治疗注射组(每周注射一次)和 37nm/kg 注射组(每四天注射一次),总剂量均为 150nm/kg。高、中、低三组抑瘤率分别为 $(43\pm 6)\%$ 、 $(64\pm 8)\%$ 、和 $(94\pm 3)\%$ 。二种人体动物模型的实验结论是在引产剂量条件下,便可见明显的抑瘤效应;一半引产剂量四次注射便可见 90%以上的抑瘤效果,即小剂量多次注射效果尤佳。

上述为人红白细胞白血病细胞癌的癌细胞接种至两种动物机体形成实体瘤后,MTCS 的治疗效果均佳。在此两种动物模型的基础上,继续用 Scid 小鼠建立了一种与临床表现更为接近的人白血病的动物模型,即一种能从小白鼠血液生化指标、白血球数量的变化反映人源白血病的小鼠。实验从小鼠尾静脉注射 3.75nm/kg、7.5nm/kg、和 15nm/kg 剂量的 MTCS,用以治疗患人红白细胞癌的小鼠,经三次注射后,上述三组白血球总数恢复至正常值的小鼠分别为 $(25\pm 6)\%$ 、 $(75\pm 8)\%$ 和 $(94\pm 3)\%$ 。即 MTCS 治疗液体瘤的剂量可小于实体瘤,而治疗液体瘤的效果却优于实体瘤。

b) 小白鼠急性毒性的研究。

选用八周龄 ICR/JCL-F1 小鼠按常规急性毒性研究法,一次注射 MTCS 和 NTCS,比较 MTCS 和 NTCS 的 LD_{50} 。结果表明:

在同一剂量条件下,动物死亡率天然组大于突变体组,且动物死亡时间天然组早于突变体组。以七天为观察时间,它们的半致死剂量分别为 $LD_{50}(NTCS)=18.4\text{mg/kg}$ 和 $LD_{50}(MTCS)=27.5\text{mg/kg}$,因而 MTCS 的急性毒性明显低于 NTCS,约下降了 50%。

c) 豚鼠体内急性过敏毒性试验。

将 NTCS 和 MTCS 分别作豚鼠体内急性过敏毒性试验。致敏用量为一次皮内注射致孕妇临床剂量的 4.5 倍剂量,14 天后进行攻击,攻击剂量为一次耳静脉注射致孕妇流产剂量的 10 倍。观察动物在 30 分钟内的反应和死亡情况。结果 NTCS 组死亡动物数与试验动物总数之比为 12/14;占 86%,MTCS 组为 3/15,占 20%,两者相较差异显著。即 MTCS 引起的豚鼠体内急性过敏程度比 NTCS 显著降低。

d) 大鼠被动皮肤过敏试验。

按 Ovary, Z. S. 的方法, 作大鼠被动皮肤过敏 (Passive Cutaneous anaphylaxis, PCA) 试验。将 N-TCS 和 M-TCS 分别致敏小白鼠, 14 天后, 分别得 NTCS 和 MTCS 的抗血清。再将两种抗血清分别注入麻醉了的大白鼠剃去毛的背部皮内, 并分别用含 NTCS 和 MTCS 的伊文思蓝注射入大白鼠的尾静脉进行攻击, 半小时后, 拉尾致死, 观察大白鼠背部皮肤蓝斑形成情况, 以蓝斑直径大于 0.5cm 者为阳性。结果显示经 N-TCS 抗血清注射的大鼠背部斑块均显阳性 (+), 而 M-TCS 抗血清注射的大鼠背部斑块均显阴性 (-)。表明 MTCS 诱发大白鼠体内 IgE 应答锐减, 原 NTCS 的阳性反应已全部消失。

三、MTCS 抗肿瘤机理的研究:

1. MTCS 诱导了敏感的肿瘤细胞的凋亡。

如上面第二条第 1 和第 2 点所述, MTCS 对体外培养中的白血病细胞有极强的杀灭作用, 而对正常细胞影响极微。我们以 MTCS 对 K562 细胞的杀灭作用为例, 经多种研究手段: 通过电子显微镜观察可见加药后 K562 细胞发生了典型的凋亡形态学改变, 细胞变小, 胞浆浓缩, 内质网扩张, 核仁消失, 染色质凝聚浓缩为一个或数个团块, 有时可形成新月状, 许多细胞内出现空泡, 最后形成有外膜包绕典型的凋亡小体。生化上抽提加药组细胞 DNA, 用琼脂糖凝胶电泳观察到“阶梯状”条带的出现, 这是凋亡的生化指标。以及利用流式细胞仪 (FACS) 检测到的凋亡细胞出现的二倍体峰 (即凋亡峰), 所有结果均表明 TCS 诱导了 K562 细胞的凋亡。

2. 敏感细胞的细胞膜上存在着能与 MTCS 专一结合的蛋白组分。

用生物分子相互作用分析系统 (Biomolecular Interaction Analysis, BIA) 研究, 当敏感细胞的细胞膜抽提液流经生物传感片, 能与固相化的 MTCS 结合, 导致感应片上的共振变化。该变化转换为 SPR 信号并以 RU (Resonance unite) 来衡量。敏感细胞均有 100 至 300 不等的 RU 变化, 表明 MTCS 与膜蛋白的大分子结合甚强。而同样处理正常细胞如人子宫羊膜细胞, 则无此变化。

3. 通过激光共聚焦扫描显微镜 (LCSM) 研究, 观察到 MTCS 可以通过受体介导形式被内吞到 K562 细胞胞浆内;

4. 通过 [35 S] GTP γ S 的结合实验, 说明 MTCS 能激活敏感细胞膜上的 G 蛋白, 而不敏感细胞则无此激活现象。表明在敏感细胞中引起了信号的产生和转导;

5. 通过激光共聚焦扫描显微镜 (LCSM) 研究, 进一步观察到外源 MTCS 刺激敏感细胞后, 能引起细胞内钙库中游离钙离子的释放和浓度变化。

根据以上研究得出的结论为：敏感细胞的细胞膜上存在着 MTCS 的受体，能介导 MTCS 进入细胞内，发挥致核糖体失活(RIP)作用；同时，MTCS 还干扰了细胞的信号转导。上述双重作用导致了细胞的凋亡。这些敏感细胞极大多数是肿瘤细胞，因而 MTCS 治疗癌症与通常抗肿瘤药物对肿瘤细胞和正常细胞两败俱伤的杀伤机理完全不同。为 MTCS 作为新要代抗肿瘤药物的临床应用提供了坚实的理论基础。

本发明的另一目的是提供了上述天花粉蛋白突变体产品的制备方法，该方法包括下列步骤：

(1) 对原 TCS 基因的改造

天然天花粉蛋白的基因是从 ATG(起始密码子)到 TAG(中止密码子)共计 870 bp(碱基对)，可从基因库或 cDNA 库筛选，或利用 PCR 方法吊取，也可以利用化学方法人工全合成，该基因编码了一个由 289 个氨基酸残基组成的前体蛋白，即它除了编码成熟的 TCS(247 氨基酸残基)外，在其 5'端前还编码了一个由 23 肽组成的前导肽或信号肽、和在其 3'端后还编码了一个延伸肽或尾肽(19 肽)。

利用分子生物学领域工作者均已知的 DNA 的定点突变方法，包括单链模板法和双链模板法(即 PCR 法)对原始的天然 TCS 基因进行突变改造：

a. 在编码成熟 TCS 的 DNA 序列的 5'端前引进限制性内切酶 Nco I 位点 (CCATGG)，也便引进了起始密码子 ATG，由此同时将编码的原成熟 TCS 的 N 端前加了一个甲硫氨酸；或引进限制性内切酶 Nde I 位点 (CATATG)，由此同时使编码的原成熟 TCS 的第一个氨基酸残基从天门冬氨酸改为甲硫氨酸。

在编码成熟 TCS 的 DNA 序列的 3'端后引进限制性内切酶 Bam H I 位点 (GGATCC)，由此同时引进了终止密码子。

b. 对编码恰当部位氨基酸残基(174-180、203-226、230-247)的 DNA 序列进行改造，以及对编码 247 位氨基酸密码子后的延伸，以获得本发明的天花粉蛋白突变体的基因。

(3) MTCS 的表达

将具有优秀性能的天花粉蛋白突变体的基因用 Nco I(或 Nde I)和 Bam H I 双酶切后克隆进质粒载体 pET-2d(或 pET-3a)，常规方法转化受体菌大肠杆菌 BL21(DE3, plysS)。转化子在 37°C 用 LB 培养液(含 Ap, Chl)中培养过夜后，用 M9ZB 培养液(含 Ap, Chl)在同样温度放大发酵培养至 570mu 的光吸收为 0.8 左右，加诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.5mM，继续培养 3 小时后离心收集菌体。菌体经超声破碎后，离心取上清液上 CM-Sephadex 或 CM-Sepharose 柱层析分离纯化，其主峰即为 MTCS 产品。

本发明的产品能用于医学临床。

除包括了原天然天花粉蛋白的一切适应症外，还扩大至抗肿瘤领域，即可应用于：

1) 抗白血病和广谱性的抗其它实体肿瘤。它的优点是能选择性地进入靶细胞，因而用量微，使用次数少。在一定的剂量范围内，对肿瘤细胞有强烈杀伤作用，而几乎不损伤正常细胞，故不良反应极微。

2) 抗病毒、抗 HIV，可用于艾滋病人的治疗，较天然 TCS 副反应少，病人可多次使用。

3) 妊娠妇女的中期引产、宫外孕，可多次使用。

实施例 1

TCS 基因的定点突变和克隆。

为方便基因操作，设计的引物有：

1. 5' GTGCAGGCC ATG GAT GTT AGG 3'

2. 5' AAC AAT ATG GCA TAG GAT CCC ATG GAT GAC 3'

引物 1 的特点是含 Nco I 位点(CCATGG)，同时引进起始密码子(ATG)。结果在编码原成熟 TCS 的 N 端前加了一个 Met；

引物 2 的特点是含 BamH I 位点(GGATCC)，结果在编码成熟的 TCS 后引进终止密码子(TAG)。

选用 Bio-Rad 公司提供的 Muta-Gene Phagemid in vitro mutagenesis 药盒，按药盒中所附的详细说明和步骤进行突变操作，最后通过 DNA 序列分析验证所获基因符合试验设计。该方法要求先将待突变的原始基因前体克隆进 phagemid(噬菌粒)系列。我们挑选了 pTZ-19U。

将上述用引物 1 突变好的 pTZ-19U-TCS 经 Nco I 和 Bam H I 在 37℃ 水解 2 小时，通过低熔点琼脂糖凝胶在 TAE 缓冲液中电泳分离和回收长度约 750bp 的 TCS 基因片段，利用 T₄ DNA 连接酶在 4℃ 与事先同样经 Nco I 和 BamH I 双酶解的表达型质粒 pET-2d 连接过夜，得到 pET-2d-TCS。

实施例 2

pET-2d-TCS 转化受体菌及其表达

pET-2d-TCS 用常规的方法转化大肠杆菌 BL21(DE3, plysS)。转化子在 37℃ 用 LB 培养液(含 Ap, Chl)中培养过夜后，再用 M9ZB 培养液(含 Ap, Chl)在同样温度放大发酵培养至 600mu 的光吸收为 0.8 左右，加诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.5mM，继续培养 3 小时后离心收集菌体。菌体经超声破碎后，离心取上清液上 CM-Sephadex 或 CM-

Sephrose 柱层析。利用含 50mM Tris-Hcl 缓冲液的(0.1-0.4)M 浓度梯度的 Nacl 分离纯化，其主峰即为表达的产品。

实施例 3

MTCS 的基因克隆

除根据需要，设计的引物不同外，其余操作均与上面实施例 1 相同。最后得到含 MTCS 基因的质粒 pET2d-MTCS。

以 MTCS^(M177, 203, 204) 为例，设计的突变引物为：

3. 5' AAG CGT GTT GAC GAA ACC TTC CTA CCA 3'

4. 5' ATT CAG ATA GCG GGA GGT AAT AAT GGA CAG 3'

引物 3 的特点是将原 177 位的 Lys 的密码子改变成 Glu 的密码子。由于密码子的兼并性，下划线部位的碱基还可以用其它编码 Glu 的碱基 GAG 替代。

引物 4 的特点是将原 203 和 204 位的 Ser 和 Thr 的密码子改变成 Gly 和 Gly 的密码子。由于密码子的兼并性，下划线部位的碱基还可以用其它编码 Gly 的碱基如：GGG GGG、GGA GGA、GGC GGC、GGT GGT 等共有 16 种替代方式。

实施例 4

MTCS 基因的转化和表达。

含 MTCS 基因的质粒 pET2d-MTCS 用常规的方法转化大肠杆菌 BL21(DE3, plysS)。MTCS 基因的转化、表达和纯化所用的方法与上述实施例 2 相同。最后得到所需的突变体 TCS，在本例的情况下，为 MTCS^(M177, 203, 204)。

实施例 5

MTCS^(M177, 203, 204) 生物学活性和免疫活性的检测。

RIP 活性按文献[8]报道方法进行，兔网织红细胞裂解液为 Promega 产品，^{[3]H}亮氨酸为 New England Nuclear 产品。抗生育活性用我们实验室常规方法进行[9]，以中期怀孕 11 天的 ICR 小鼠为模型，背部注射 MTCS^(M177, 203, 204) 75n mole/kg 药物剂量，48 小时后断颈处死小鼠。解剖记录总胎鼠数及死亡胎鼠数(包括胎儿吸收点)，计算胎鼠死亡率。体外免疫活性用 Elisa 方法检测，IgG 抗体和单克隆抗体 IgE 为我们实验室自行制备和纯化[10]。纯化方法用亲和层析柱，其中 TCS-Sepharose 4B 按溴化氰活化方法制备。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳按 Laemmli 方法进行，电泳后用 0.25%考马氏亮兰 R250 染色。以上各项实验结果除阴性对照外，均用 NTCS 为阳性对照。实验结果小结为：

| 产品 | 氨基酸改动点 | RIP 活性 (%) | 抗生育活性 (%) | 体外免疫反 应能力 IgG | 体外免疫反 应能力 IgE |
|------|---------------|---------------|--------------|------------------|------------------|
| NTCS | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| MTCS | 177, 203, 204 | 100 | 100 | <10 | <10 |

实施例 6

MTCS^(M177, 203, 204)对 K562 细胞的杀灭效应

用实验室常规的 MTT 方法测定 MTCS^(M177, 203, 204)对 K562 细胞的杀灭效应。人红白细胞型白血病 K562 与采自临床分离的正常人淋巴细胞，分别在含有 10%灭活小牛血清的 RPMI-1640 培养液内、于 37°C、5%CO₂ 条件下，以 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 接种细胞，并分别加入 1、5、10、20、50、100ug/ml 的 MTCS。培养 48 小时后每孔加入 25ulMTT(购自 Sigma)(5mg/ml)，2 小时后每孔加入 Lysing Buffer 终止反应，37°C 放置过夜，用酶标仪测定各孔 A₅₇₀ 值。最后结果显示 MTCS 对 K562 的 LC₅₀ 为 11.0ug/ml，而对正常人外周血淋巴细胞不敏感，在上述实验剂量 MTCS 的浓度高达 1000ug/ml 条件下，测不出 LC₅₀ 值。